

20. 7. 2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

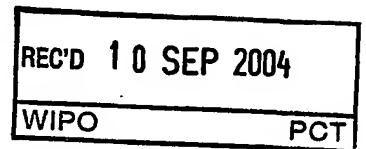
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年   7 月 1 8 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 2 7 6 6 3 2  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [J] P 2 0 0 3 - 2 7 6 6 3 2]

出      願      人            株式会社林原生物化学研究所  
Applicant(s):

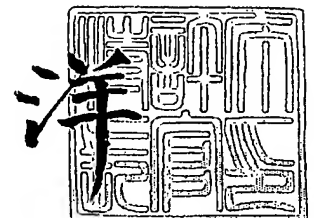


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   8 月 2 6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 10102501  
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿  
【国際特許分類】 C07H 3/06  
C12P 19/00  
C12P 19/18

【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内  
    【氏名】 西本 友之

【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内  
    【氏名】 渡辺 光

【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内  
    【氏名】 福田 恵温

【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内  
    【氏名】 三宅 俊雄

【特許出願人】  
    【識別番号】 000155908  
    【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所  
    【代表者】 林原 健

【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 035736  
    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

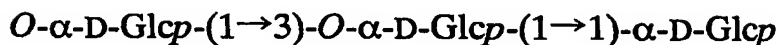
## 【書類名】 特許請求の範囲

## 【請求項 1】

分子内に化学式 1 で示される  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース構造を有する 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類。

化学式 1:

【化 1】

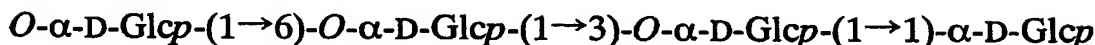


## 【請求項 2】

3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類が、化学式 2 で示される 3- $\alpha$ -イソマルトシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースである請求項 1 記載の 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類。

化学式 2:

【化 2】

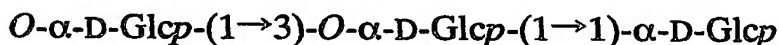


## 【請求項 3】

3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類が、化学式 3 で示される 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースである請求項 1 記載の 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類。

化学式 3:

【化 3】



## 【請求項 4】

非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 6 グルコシド結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシド結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質と  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースとを含有する水溶液に  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させる工程を含むことを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類の生成方法。

## 【請求項 5】

非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 6 グルコシド結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシド結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質が、澱粉部分分解物に  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させることにより調製される請求項 4 記載の 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類の生成方法。

## 【請求項 6】

更にグルコアミラーゼを作用させる工程を含むことを特徴とする請求項 4 又は 5 記載の 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類の生成方法。

## 【請求項 7】

化学式 2 で示される 3- $\alpha$ -イソマルトシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース及び／又は化学式 3 で示される 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースと任意の他の糖質を含む水溶液に糖転移酵素を作用させて請求項 1 記載の  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類を生成せしめることを特徴とする  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類の生成方法。

## 【請求項 8】

非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 6 グルコシド結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシド結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質と  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースとを含有する水溶液に  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させて化

学式 2 で示される 3- $\alpha$ -イソマルトシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースを生成せしめ、これを採取することを特徴とする請求項 2 記載の 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類の製造方法。

【請求項 9】

非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 6 グルコシド結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシド結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質が、澱粉質に  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させることにより調製される請求項 8 記載の 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類の製造方法。

【請求項 10】

非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 6 グルコシド結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシド結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質と  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースとを含有する水溶液に  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させて化学式 2 で示される 3- $\alpha$ -イソマルトシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースを生成せしめ、次いで、これにグルコアミラーゼを作用させて化学式 3 で示される 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースを生成せしめ、これを採取することを特徴とする請求項 3 記載の 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類の製造方法。

【請求項 11】

請求項 2 及び／又は請求項 3 記載の 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類と任意の他の糖質を含む水溶液に糖転移酵素を作用させて請求項 1 記載の  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類を生成せしめ、これを採取することを特徴とする  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類の製造方法。

【請求項 12】

採取する方法が、塩型強酸性カチオン交換樹脂を充填したカラムクロマトグラフィーを用いることを特徴とする請求項 8 乃至 11 のいずれかに記載の  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類の製造方法。

【請求項 13】

請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類を含有せしめた組成物。

【請求項 14】

請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類とともに、他の非還元糖、還元糖、糖アルコール及びミネラルから選ばれる 1 種以上の成分を含有せしめた請求項 13 記載の組成物。

【請求項 15】

組成物が、口中使用物、飲食物、化粧品又は医薬品である請求項 13 又は 14 記載の組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類とその製造方法並びに用途

【技術分野】

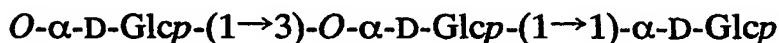
【0001】

本発明は、新規糖質3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類とその製造方法並びに用途、詳細には、分子内に化学式1で示される3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース構造を有する3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類とその製造方法並びに用途に関する。

【0002】

化学式1:

【化1】



【背景技術】

【0003】

$\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースは、グルコース2分子が $\alpha$ ,  $\alpha-1$ , 1結合で結合した非還元性二糖であり、少量ながら、カビ、酵母、細菌、きのこ、高等植物、昆虫など、広く自然界に存在している。 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースは、非還元性ゆえに、アミノ酸や蛋白質等のアミノ基を有する物質とメイラード反応（アミノカルボニル反応）を起こさず、アミノ酸含有物質を損なわないこと、しかも、それ自身安定な糖質であることから、褐変、劣化を懸念することなく、利用、加工でき、広範囲な用途が期待されてきた。 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースが有する機能に関する研究も進んでいるものの、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースにない新たな機能が期待できる糖質として $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースの糖誘導体に関する研究も活発に行われているのが現状である。

【0004】

$\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースの糖誘導体の酵素による合成例は、数多く報告されている。 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースにグルコースが $\alpha-1$ , 2結合で付加した構造を有するオリゴ糖については、例えば、トレハロースホスホリラーゼとコージビオースホスホリラーゼの転移作用により、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースから生成する2-O- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース（別名 $\alpha$ -コージビオシル $\alpha$ -D-グルコシド又はセラギノース）が特許文献1及び非特許文献1に記載されている。

【0005】

$\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースにマルトース、マルトトリオースなどのマルトオリゴ糖が $\alpha-1$ , 4結合で付加した構造を有するオリゴ糖については、例えば、特許文献2に、澱粉又は澱粉部分分解物（以下、単に「澱粉質」と略称する。）を含有する水溶液に非還元性糖質生成酵素を作用させることにより生成する、 $\alpha-1$ , 4結合様式の澱粉質構造を持つ分子の末端にトレハロース構造を有する4- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類、例えば、4- $\alpha$ -D-グルコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース、4- $\alpha$ -マルトシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース、4- $\alpha$ -マルトトリオシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース、4- $\alpha$ -マルトテトラオシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースなどが開示されており、さらに非特許文献2には、バチルス・ステアロサーモフィルス（*Bacillus stearothermophilus*）のサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（CGTase）の糖転移作用により、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースとサイクロマルトヘキサオースとから生成する $\alpha$ -マルトシル $\alpha$ -D-グルコシド、 $\alpha$ -マルトトリオシル $\alpha$ -D-グルコシド、 $\alpha$ -マルトシル $\alpha$ -マルトシド、 $\alpha$ -マルトトリオシル $\alpha$ -マルトシド、 $\alpha$ -マルトトリオシル $\alpha$ -マルトトリオシドなどが記載されている。

【0006】

$\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースにグルコースが $\alpha-1$ , 6結合で付加した構造を有するオリゴ糖については、例えば、非特許文献3には、サッカロマイセス・スピーシーズ（*Saccharomycopsis*

*aromyces* sp.) の $\alpha$ -グルコシダーゼ、あるいはリゾプス・ニベウス (*Rhizopus niveus*) のグルコアミラーゼによる $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースとグルコースとの縮合反応により生成する $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ -D-グルコシドが記載されており、また、非特許文献4には、アルスロバクター・グロビホルミス (*Arthrobacter globiformis*) T6のイソマルトデキストラナーゼの転移作用によりデキストランと $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースとから生成する、 $\alpha$ -イソマルトトリオシル $\alpha$ -D-グルコシドが開示されており、また、非特許文献5及び特許文献3には、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) の $\alpha$ -グルコシダーゼの転移作用により $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースとマルトテトラオースとから生成する、 $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ -D-イソマルトシドが開示されている。

#### 【0007】

しかしながら、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースに $\alpha$ -1, 3結合で他の糖質が結合した構造を有する糖質はこれまで全く知られていなかった。

#### 【0008】

一方、 $\alpha$ -1, 3グルコシド結合を有するオリゴ糖としては、グルコース2分子が $\alpha$ -1, 3結合した還元性二糖であるニゲロースや、マルトオリゴ糖の非還元末端グルコース残基にグルコースが $\alpha$ -1, 3結合で付加した構造を有するニゲロオリゴ糖 (特許文献4及び5を参照) が知られている。特許文献6に開示されているように、ニゲロースを構成単位として含有する糖質は低甘味、味質改善といった甘味料としての機能に加え、高い免疫賦活作用を持つことが知られている。しかしながら、ニゲロース及びニゲロオリゴ糖はいずれも還元性を示す糖質であり、アミノ酸との褐変反応を起こし易く、食品加工上、変質、劣化を招き易い欠点を有している。

#### 【0009】

このような状況下、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースに他の糖質が $\alpha$ -1, 3結合で付加した、例えば、3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースや3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースなどの糖質、すなわち、分子内に化学式1で示される3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース構造を有する3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類のような $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース構造とニゲロース構造とを併せ持つ非還元性のオリゴ糖の開発が望まれている。

#### 【0010】

【特許文献1】特開平10-304882号公報

【特許文献2】欧州特許出願公開第0606753A2号明細書

【特許文献3】特開平8-217784号公報

【特許文献4】特開平7-59559号公報

【特許文献5】特開平9-299095号公報

【特許文献6】特開平9-52834号公報

【非特許文献1】茶園、『ジャーナル オブ アプライド グリコサイエンス (Journal of Applied Glycoscience)』、(日本)、1999年、第46巻、第4号、第423頁乃至429頁

【非特許文献2】栗本、『バイオサイエンス バイオテクノロジー バイオケミストリー (Biosciences Biotechnology Biochemistry)』、(日本)、1997年、第61巻、第7号、第1146頁乃至1149頁

【非特許文献3】鯨坂、『カーボハイドレート・リサーチ (Carbohydrate Research)』、(オランダ)、1990年、第199巻、第227乃至234頁

【非特許文献4】金、『澱粉科学』、(日本)、1993年、第40巻、第3号、第349頁

【非特許文献5】栗本、『バイオサイエンス バイオテクノロジー バイオケミストリー (Biosci. Biotech. Biochem.)』、(日本)、1997年、第61巻、第4号、第699頁乃至703頁

【非特許文献6】エム・ステイシー (M. Stacey)、『メソッズ イン カーボハイドレート ケミストリー (Methods in Carbohydrate Chemistry)』、I、アカデミック・プレス (Academic Press) 1962年、第339乃至341頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、分子内に化学式1で示される3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース構造を有する新規糖質3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類（以下、単に「3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類」と略称する。）とその製造方法を確立し、その用途を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

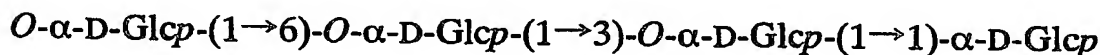
【0012】

本発明者等は、上記課題を解決するため新規糖質3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類とその製造方法について鋭意研究した。その結果、化学式2で示される新規糖質3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース及び化学式3で示される新規糖質3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを見出し、また、これら新規糖質に対して更に他の糖質を結合させることにより、容易に他の種々の3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類を合成できることを見出し、さらにはこれら3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類を含む糖質及びその製造方法を確立して本発明を完成した。併せて、これら糖質又はこれらを含む糖質組成物を含むせしめた飲食物、化粧品、医薬品などの組成物を確立して、本発明を完成した。

【0013】

化学式2：

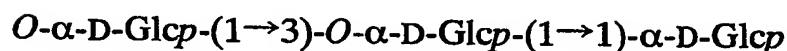
【化2】



【0014】

化学式3：

【化3】



【発明の効果】

【0015】

本発明の3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類は従来未知の新規糖質であり、分子内に $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース構造とニゲロース構造を併せ持つ非還元性糖質であることから種々の機能が期待できる糖質である。加えて、3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類とその製造方法並びに用途を提供する本発明は斯界に大いに貢献する有用な発明である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明でいう3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類とは、分子内に化学式1で示される3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース構造を有する糖質全般を意味し、その分子内に $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース構造とニゲロース構造を併せ持つ非還元性糖質である。

【0017】

本発明の3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類は、分子内に前記化学式1で示される3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース構造を有する糖質でさえあればよく、その給源や製造方法によって制限されず、仮に天然物として存在する場合には天然由来のもの

であっても、また、化学的・酵素的に合成したものであってもよい。本発明における化学式2で示される3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース（以下、単に「3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース」と略称する。）及び化学式3で示される3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース（以下、単に「3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース」と略称する。）は、いずれも上記3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類に含まれる糖質の具体例である。

#### 【0018】

本発明の3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースは、化学合成することもできるものの、酵素反応により、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースにイソマルトースが $\alpha$ -1, 3結合するよう糖転移させて生成させるのが好適である。酵素反応による3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースの生成方法としては、例えば、パノース（4- $\alpha$ -イソマルトシルD-グルコース）、4- $\alpha$ -イソマルトシルマルトース、4- $\alpha$ -イソマルトシルマルトリオースなどの、非還元末端の結合様式として $\alpha$ -1, 6グルコシド結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha$ -1, 4グルコシド結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質（以下、本明細書では「 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質」と略称する。）と $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースとを含有する水溶液に、本出願人が国際特許出願公開WO 02/40659 A1に開示したバチルス・グロビスポルス C9 (*Bacillus globisporus* C9、受託番号FERM BP-7143)、バチルス・グロビスポルス C11 (*Bacillus globisporus* C11、受託番号FERM BP-7144)、バチルス・グロビスポルス N75 (*Bacillus globisporus* N75、受託番号FERM BP-7591) あるいはアルスロバクター・グロビホルミス A19 (*Arthrobacter globiformis* A19、受託番号FERM BP-7590) など微生物由来の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させて、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質の $\alpha$ -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分との結合を特異的に切断し、この $\alpha$ -イソマルトシル部分を $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースに $\alpha$ -1, 3転移させて生成させるのが有利である。

#### 【0019】

本発明において用いる $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースは、市販品を利用するのが好適である。 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースの市販品としては、高純度含水結晶 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース（（株）林原商事販売、登録商標『トレハ』、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含量98%以上）が有利に利用できる。また、必要に応じて、公知の方法、例えば、酵母から抽出するか、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース生成能を有する細菌の培養液から分離するか、又は澱粉質に酵素を作用させるかなどして調製した $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを利用することも有利に実施できる。

#### 【0020】

本発明において用いる $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質としては、市販の試薬級パノース（（株）林原生物化学研究所販売）を利用することができる。また、必要に応じて、パノースを公知の方法、例えば、天然多糖プルランにサーモアクチノマイセス プルガリス (*Thermoactinomyces vulgaris*) などの微生物由来のパノース生成 $\alpha$ -アミラーゼを作用させて調製することもできる。さらに、 $\alpha$ -1, 4グルコシド結合を $\alpha$ -1, 6グルコシド結合に変換できるアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saitoi*)、ムコール・ヤバニカス (*Mucor javanicus*)、ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium crysogenum*)、キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*) など微生物由来の $\alpha$ -グルコシダーゼを澱粉質に作用させてパノース、4- $\alpha$ -イソマルトシルマルトース、4- $\alpha$ -イソマルトシルマルトリオースなどの $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質を調製することもできる。さらには、本出願人が国際特許出願公開WO 02/055708 A1に開示したバチルス・グロビスポルス C9 (*Bacillus globisporus* C9、受託番号FERM BP-7143)、バチルス・グロビスポルス C11 (*Bacillus glo*



bisporus C11、受託番号FERM BP-7144)、バチルス・グロビスポルス N75 (Bacillus globisporus N75、受託番号FERM BP-7591)あるいはアルスロバクター・グロビホルミス A19 (Arthrobacter globiformis A19、受託番号FERM BP-7590)など微生物由来の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を澱粉質に作用させて調製した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質も有利に利用できる。

#### 【0021】

3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを生成させるための酵素反応の条件は、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースが生成する方法であればよく、通常、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースと $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質とを含有する水溶液に、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質グラム当たり0.1単位以上、望ましくは1乃至100単位を、温度20乃至80℃、pH3乃至9から選ばれる条件で、0.1乃至100時間、望ましくは、1乃至70時間程度作用させればよい。本発明に用いる $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の活性1単位は、1w/v%パノースを基質にして、30℃、pH6.0の条件で、1分間に1 $\mu$ モルのグルコースを生成する酵素量と定義した。この酵素反応液には、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースとともに、これに、 $\alpha$ -イソマルトシル基が $\alpha$ -1,3結合で1乃至数個結合したオリゴ糖などが生成する。この反応液には、通常、グルコース、マルトオリゴ糖などの還元性糖質、サイクロ {→6}- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1→)の構造を有する環状四糖(以下、本明細書では単に「環状四糖」と略称する。)、未反応の $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースなども含まれる。

#### 【0022】

本発明の3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースは、化学的に合成することも可能であるが、上記で生成した3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有溶液に、さらにグルコアミラーゼ(EC3.2.1.3)を作用させ、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースの $\alpha$ -1,6グルコシド結合を特異的に切断することにより容易に生成させることができる。

#### 【0023】

本発明において、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースからの3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースの調製に用いるグルコアミラーゼとしては、 $\alpha$ -1,6グルコシル結合を容易に加水分解し、 $\alpha$ -1,3グルコシル結合を加水分解しにくい酵素であればよく、例えばアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)やリゾプス・ニベウス(Rhizopus niveus)など微生物由来のグルコアミラーゼが有利に利用できる。

#### 【0024】

グルコアミラーゼを作用させる酵素反応の条件は、3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースが生成する方法であればよく、通常、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有溶液にグルコアミラーゼを糖質グラム当たり10単位以上、望ましくは100乃至5000単位を、温度20乃至80℃、pH3乃至9から選ばれる条件で、0.1乃至100時間、望ましくは、1乃至70時間程度作用させればよい。本発明に用いるグルコアミラーゼの活性1単位は、1w/v%可溶性澱粉を基質にして、40℃、pH4.5の条件で、30分間に10mgのグルコースを生成する酵素量と定義した。この酵素反応により、3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースとともに、これに、 $\alpha$ -ニゲロシル基が $\alpha$ -1,6結合で1乃至数個結合したオリゴ糖などが生成する。この反応液には、通常、グルコース、ニゲロースなどの還元性糖質、環状四糖、未反応の $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースなども含まれる。

#### 【0025】

本発明の3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース及び/又は3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを含有する水溶液に、適宜の糖質とこれを糖供与体として糖転移反

応を触媒する酵素、例えば、澱粉質と $\alpha$ -アミラーゼ、澱粉質とサイクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ、乳糖と $\beta$ -ガラクトシダーゼなどを共存させ、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース及び/又は3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを糖受容体として糖転移反応させることにより、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース及び/又は3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースに更に他の糖質が結合した構造を有する種々の糖質誘導体、すなわち、前記した3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類を容易に酵素合成することができる。澱粉質と $\alpha$ -アミラーゼ又は澱粉質とサイクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼを共存させて反応させた場合には、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースのイソマルトシル残基又は3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースのグルコシル残基、さらには $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを構成するグルコシル残基にマルトオリゴ糖が $\alpha$ 結合で付加した構造を有する3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類を酵素合成することができる。また、乳糖と $\beta$ -ガラクトシダーゼを共存させて反応させた場合には、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースのイソマルトシル残基又は3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースのグルコシル残基にガラクトースが $\beta$ 結合で付加した、構成糖としてグルコース以外にガラクトースを有するヘテロな3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類を酵素合成することもできる。

#### 【0026】

以上述べたような酵素反応によって生成される3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類含有溶液は、通常、固形物当たり、3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類を5乃至15w/w%（以下、本明細書では、特にことわらない限り、w/w%を%と略称する。）程度含有しており、これを濾過、精製して液状又はシラップ状で使用することも、更に、乾燥して固状で利用することも随意である。

#### 【0027】

必要ならば、3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類の特徴を生かすために、上記含有溶液を、更に、分離・精製して3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類高含有物にして利用することもできる。分離・精製の方法としては、例えば、酵母発酵法、膜濾過法、分別沈殿法、アルカリ処理法、カラムクロマトグラフィーなどにより夾雑糖類を分離除去する方法が適宜採用できる。とりわけ、特公昭62-50477号公報、特公平4-50319号公報などに開示されている塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより、夾雑糖類を除去して、高含有画分を採取する方法を有利に実施できる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

#### 【0028】

また、必要ならば、3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類含有糖質を、常法に従って、水素添加し、それらに含まれるグルコース、マルトースなどの還元性糖質を糖アルコールにして還元力を消失させ、実質的に還元性を示さない3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類含有糖質を製造することも有利に実施できる。

#### 【0029】

本発明の3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類は、それ自身が非還元性で、極めて安定であり、低甘味ではあるが良質で温和な甘味を有し、また、化学的に安定であり、糖類と褐変反応を起こし易いアミノ酸、オリゴペプチド、更には、有効成分、活性の失われやすい生理活性物質などを安定化し得ると共に、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他の糖質の晶出防止性、難発酵性、澱粉老化防止性などの性質を具備している。

#### 【0030】

3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類の持つこれらの諸性質は、飲食物、嗜好物、飼料、餌料などの口中使用物、飲食物、更には、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に使用できる。とりわけ、3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類を、他の非還元性オリゴ糖、還元性オリゴ糖、糖アルコール及びミネラルから選ばれる1種以上の成分とともに含有せしめて各種組成物を製造することも有利に実施できる。

## 【0031】

本発明の3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類含有糖質及びこれから分離し得られる3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類高含有物は、そのまま甘味付けのための調味料として使用することができる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、マルトース、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース、蔗糖、ラクトスクロース、異性化糖、蜂蜜、メイプルシュガー、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド、レバウディオシド、グリチルリチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の1種又は2種以上の適量と混合して使用してもよく、また必要ならば、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と混合して使用することもできる。

## 【0032】

また、本発明の3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類含有糖質及びこれから分離し得られる3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類高含有物の粉末状製品は、そのまま、又は必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成型して使用することも随意である。

## 【0033】

また、本発明の3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類含有糖質及びこれから分離し得られる3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類高含有物の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付け、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。

## 【0034】

例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、たくあん漬の素、白菜漬の素、焼肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなど各種調味料として有利に使用できる。

## 【0035】

また、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンデーなどの洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペースト、スプレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢こんぶ、さきするめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、こんぶ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、清酒、合成酒、リキュール、洋酒などの酒類、紅茶、コーヒー、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席するこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤などの各種飲食物への甘味付に呈味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。

## 【0036】

また、家畜、家禽、その他蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のために飼料、餌料などの嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、又は呈味改良剤、矯味剤として、更には、品質改良剤として有利に利用できる。

## 【0037】

品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失い易い各種生理活性物質又はこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適應できる。例えば、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\beta$ 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキン2などのリンホカイン含有液、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモン、胎盤ホルモンなどのホルモン含有液、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤含有液、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質含有液、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン含有液、リパーゼ、エラスターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素含有液、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌、ロイヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の健康食品や医薬品などを容易に製造できる。

## 【0038】

以上述べたような各種組成物に3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類含有糖質又はこれから分離し得られる3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類高含有物を含む含有せしめる方法は、その製品が完成するまでの工程で含有せしめればよく、例えば、混和、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常、0.1%以上、望ましくは、0.5%以上含有せしめるのが好適である。

## 【0039】

次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

## 【0040】

<実験1:  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の調製>

## 【0041】

<実験1-1: 培養>

澱粉部分分解物『パインデックス#4』4.0% (w/v)、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8% (w/v)、リン酸二カリウム0.1% (w/v)、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06% (w/v)、硫酸マグネシウム・7水塩0.05% (w/v)、及び水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス・グロビスポルス C11株を接種し、27℃、230rpmで48時間回転振盪培養したものを種培養とした。容量30Lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20L入れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1% (v/v)を接種し、温度27℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後、培養物中の酵素活性を測定したところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約0.55単位/mlで、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は約1.8単位/mlであった。この培養物を遠心分離(10,000rpm、30分間)して回収した上清約18Lの酵素活性を測定したところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約0.51単位/ml(総活性約9,180単位)で、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は約1.7単位/ml(総活性約30,400単位)であった。

## 【0042】

尚、前記2種類の酵素活性は次のようにして測定した。即ち、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性の測定は、マルトトリオースを濃度2% (w/v)となるよう100mM酢酸緩衝液(pH6.0)に溶解させ基質液とし、その基質液0.5mlに酵素液0

、5 ml 加えて、35℃で60分間酵素反応し、その反応液を10分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中のマルトース含量を高速液体クロマトグラフィー法（以下、「HPLC」と略称する。）で定量することによって行った。 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性1単位は、上記の条件下で1分間に1  $\mu$ モルのマルトースを生成する酵素量と定義した。尚、HPLCは、『Shodex KS-801』カラム（昭和電工（株）製）を用い、溶離液として水を用いて、カラム温度60℃、流速0.5 ml/minの条件で行い、検出は示差屈折計『RI-8012』（東ソー（株）製）を用いて行なった。

#### 【0043】

また、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性の測定は、パノースを濃度2%（w/v）となるように100 mM酢酸緩衝液（pH 6.0）に溶解させて基質液とし、その基質液0.5 mlに酵素液0.5 ml加えて、35℃で30分間酵素反応し、その反応液を10分間煮沸して反応を停止させた後、その反応停止液中のグルコース量をグルコースオキシダーゼ法で定量することにより行った。 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の活性1単位は、上記の条件下で1分間に1  $\mu$ モルのグルコースを生成する酵素量と定義した。

#### 【0044】

##### <実験1-2：部分精製酵素標品の調製>

実験1-1の方法で得た培養上清約18 Lを80%飽和硫酸液で塩析して4℃、24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離（10,000 rpm、30分間）して回収し10 mMリン酸緩衝液（pH 7.5）に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約416 mlを得た。この粗酵素液は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を約8,440単位、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を約28,000単位含んでいた。この粗酵素液を『セパビーズ（Sepabeads）FP-DA13』ゲル（三菱化学（株）製）を用いたイオン交換クロマトグラフィーに供した。 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性成分、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性成分は、何れも、『セパビーズ（Sepabeads）FP-DA13』ゲルには吸着せずに、両酵素活性は非吸着画分に検出された。この非吸着画分を回収し、1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル（Sephacryl）HR S-200』ゲル（アマシャム・ファルマシア・バイオテック（株）製）を用いたアフィニティークロマトグラフィー（ゲル量500 ml）に供した。酵素活性成分は、『セファクリル（Sephacryl）HR S-200』ゲルに吸着し、硫酸1 Mから0 Mに濃度低下するリニアグラジエント、これに続いて、マルトテトラオース0 mMから100 mMに濃度上昇するリニアグラジエントで溶出させたところ、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性成分と $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性成分は分離して溶出し、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は硫酸リニアグラジエント濃度が約0.3 M付近の画分に検出され、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテトラオースのリニアグラジエント濃度が約30 mM付近の画分に検出された。そこで、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性画分とを個別に回収し、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部分精製酵素標品、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を有する部分精製酵素標品としてそれぞれ回収し、これら酵素標品を別々に精製した。

#### 【0045】

##### <実験1-3： $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製>

実験1-2の方法で得た $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部分精製酵素標品を、1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチルートヨパール（Butyl-Toyopearl）650M』ゲル（東ソー（株）製）を用いた疎水クロマトグラフィー（ゲル量350 ml）に供した。本酵素活性成分は、『ブチルートヨパール（Butyl-Toyopearl）650M』ゲルに吸着し、硫酸1 Mから0 Mに濃度低下するリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3 M付近で吸着した酵素活性成分が溶出し、本

酵素活性を示す画分を回収した。再度、この回収画分を、1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する酵素標品の酵素活性量、比活性及び収率を表1に示す。

【0046】

【表1】

工 程	$\alpha$ -イソマルトシル グルコ糖質生成酵素 活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル グルコ糖質生成酵素 比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
培養上清	9,180	0.1	100
硫酸塩析後の透析液	8,440	0.6	91.9
イオン交換カラム溶出液	6,620	1.1	72.1
アフィニティカラム溶出液	4,130	8.8	45.0
疎水カラム溶出液	3,310	11.0	36.1
アフィニティカラム溶出液	2,000	13.4	21.8

【0047】

精製した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を7.5% (w/v) 濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

【0048】

<実験1-4:  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製>

実験1-2の方法で得た $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を有する部分精製酵素標品を、1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチルートヨパール (Butyl-Toyoppearl) 650 M』ゲル (東ソー (株) 製) を用いた疎水クロマトグラフィー (ゲル量350 ml) に供した。本酵素活性成分は、『ブチルートヨパール (Butyl-Toyoppearl) 650 M』ゲルに吸着し、硫酸1 Mから0 Mに濃度減少するリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3 M付近で溶出した。この本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を、1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップに於ける $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を有する酵素標品の酵素活性量、比活性及び収率を表2に示す。

【0049】

【表2】

工 程	$\alpha$ -イソマルトシル 転移酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル 転移酵素比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
培養上清	30,400	0.45	100
硫酸塩析後の透析液	28,000	1.98	92.1
イオン交換カラム溶出液	21,800	3.56	71.7
アフィニティカラム溶出液	13,700	21.9	45.1
疎水カラム溶出液	10,300	23.4	33.9
アフィニティカラム溶出液	5,510	29.6	18.1

【0050】

精製した $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性有する酵素標品を7.5% (w/v) 濃度ポ

リアクリルアミドを含むゲル電気泳動によりその純度を検定したところ、その蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

#### 【0051】

##### <実験2：転移糖Aの生成>

固形物として17.1グラムの $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、固形物として6.3グラムのパノース及び50mM酢酸緩衝液(pH6.0)を含む水溶液100mlを30℃に調整した後、実験1-4の方法で調製した精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素をパノース1g当たり5単位加えて、24時間、30℃に保温して転移反応を行った。次いで100℃に10分間加熱して酵素を失活させ、反応を停止した。得られた反応液の糖組成をHPLCで調べた。HPLCの結果を表3に示す。

#### 【0052】

【表3】

HPLCの溶出時間(分)	糖質の種類	糖組成(%)
44.2	転移糖A	13.7
51.5	$\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース	66.6
58.9	グルコース	7.9
62.0	環状四糖	6.3
—	その他	5.5

#### 【0053】

表3に示すように、未反応の $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース(溶出時間51.5分)、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素がパノースに作用して生成するグルコース(溶出時間58.9分)や環状四糖(溶出時間62.0分)などの他に、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素がパノースと $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースに作用し生じたと考えられる転移糖A(以下、単に「転移糖A」と略称する。)(溶出時間44.2分)が検出され、その生成量は糖組成として13.7%であることがわかった。 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の反応特異性を考慮すると、生成した転移糖Aは、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースに $\alpha$ -イソマルトシル残基が $\alpha$ -1,3結合した構造を有する3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースと推定された。

#### 【0054】

なお、HPLCは、『エムシーアイゲル(MCI GEL)CK04SSカラム』(三菱化学株式会社製造)を2本直列につないだものを用い、溶離液として水を用いて、カラム温度80℃、流速0.4ml/分の条件で行い、検出は示差屈折計『RI-8012』(東ソー株式会社製造)を用いて行なった。

#### 【0055】

##### <実験3：転移糖Aの精製>

実験2の方法で得られた反応液(約100ml)に水酸化ナトリウムを添加しpHを12に調整した後、98℃で2時間保持して、グルコースなどの還元糖を分解した。続いて、三菱化学製イオン交換樹脂『ダイヤイオンSK-1B』と『ダイヤイオンWA30』を用いて脱色、脱塩し、さらに、『ダイヤイオンSK-1B』とオルガノ製アニオン交換樹脂『IRA411』を用いて再度脱塩し、常法に従って濾過しエバポレータで濃縮し、糖濃度を測定したところ固形物として18.8グラムを含む濃縮液が得られた。この濃縮液をHPLCで分析したところ、糖組成として、転移糖Aを15.7%、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを76.6%、環状四糖を7.2%、その他の糖質を0.5%含有していることがわかった。

#### 【0056】

次いで、得られた濃縮液を分取HPLCに供したところ、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースは溶出時間約36乃至43分に溶出し、転移糖Aと環状四糖とがほぼ同じ溶出時間53乃至60分に溶出した。転移糖Aと環状四糖を含有する画分を回収し、固形物として3.6グラムの転移糖A部分精製物を得た。HPLCで分析したところ、糖組成として、転移糖Aが6



0.2%で、環状四糖が39.8%であった。なお、分取HPLCは、『オーディーエス  
エイキュー (ODS-AQ) R355-15AQカラム』(株式会社ワイエムシイ製造)  
を用い、溶離液として水を用いて、カラム温度25℃、流速20ml/分の条件で行い、  
検出は示差屈折計『ERC-7530』(エルマ光学株式会社製造)を用いて行なった。

#### 【0057】

続いて、転移糖A部分精製物中の環状四糖をイソマルトースに分解するために、イソマルトデキストラナーゼ処理を行った。即ち、転移糖A部分精製物を糖濃度として1%含有する水溶液をpH5.0、温度50℃に調整し、アルスロバクター・グロビフォルミス由来イソマルトデキストラナーゼを固形物グラム当たり1,000単位加え、50℃で24時間処理した後、100℃で10分間加熱して酵素を失活させ、酵素処理を停止した。得られた処理液を脱塩、濃縮し、固形物として3.4グラムの処理物を得た。HPLCで分析したところ、糖組成として、転移糖Aが56.7%で、イソマルトースが43.3%であった。なお、アルスロバクター・グロビフォルミス由来イソマルトデキストラナーゼは、『アグリカルチュラル・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural Biobiochemical Chemistry)』、第52巻、第495頁乃至第501頁(1988年)に記載の方法で調製した。

#### 【0058】

得られた処理物中の転移糖Aとイソマルトースを上記の分取HPLCで分離し、転移糖Aを含有する画分を回収し、それを濾過、濃縮して、固形物として1.6グラムの転移糖A精製物を得た。HPLCで分析したところ、糖組成として、転移糖Aが99.9%以上であり、極めて高純度の転移糖A標品であることがわかった。

#### 【0059】

<実験4: 転移糖Aの構造解析>

#### 【0060】

<実験4-1: 質量分析>

実験3の方法で得られた転移糖A精製物を、サーモエレクトロン社製質量分析装置『LCC Advantage』を用いてエレクトロスプレーイオン化法により質量分析したところ、質量数689のナトリウム付加分子イオンが顕著に検出され、本糖質の質量数が666であることが判明した。

#### 【0061】

<実験4-2: 構成糖の分析>

実験3の方法で得られた転移糖A精製物について、常法に従い硫酸で加水分解した後、ガスクロマトグラフィー法で構成糖を調べたところ、D-グルコースのみが検出され、本糖質の構成糖はD-グルコースであることが判明した。

#### 【0062】

<実験4-3: メチル化分析>

実験3の方法で得られた転移糖A精製物について、常法に従ってメチル化した後、酸により加水分解し、続いて還元、アセチル化し、得られた部分メチルヘキシトールアセテートをガスクロマトグラフィー法で調べた。その結果、2,3,4,6-テトラメチル-1,5-ジアセチルグルシトール、2,4,6-トリメチル-1,3,5-テトラアセチルグルシトール、及び2,3,4-トリメチル-1,5,6-テトラアセチルグルシトールが1.9 : 1.1 : 1.0の比率で検出され、本糖質は、1位が結合に関与したグルコース残基が2分子と、1位と3位が結合に関与したグルコース残基が1分子と、1位と6位が結合に関与したグルコース残基が1分子とからなることが判明した。

#### 【0063】

<実験4-4: 核磁気共鳴法 (NMR) >

実験3の方法で得られた転移糖A精製物について、JEOL社製NMR装置『JMN-AL300』を用いてNMR分析したところ、図1に示す<sup>1</sup>H-NMRスペクトル及び図2に示す<sup>13</sup>C-NMRスペクトルが得られ、これらスペクトルから本糖質における各炭素の化学シフト値の帰属を行なった。結果を表4に示す。



【0064】

【表4】

グルコース残基	炭素番号	化学シフト値 (ppm)
a	1	95.3
	2	73.3
	3	74.7
	4	72.0
	5	74.0
	6	62.9
b	1	95.5
	2	72.1
	3	83.5
	4	71.8
	5	74.5
	6	62.8
c	1	101.9
	2	73.8
	3	75.4
	4	71.8
	5	72.6
	6	67.7
d	1	100.0
	2	74.0
	3	75.4
	4	72.1
	5	74.1
	6	62.6

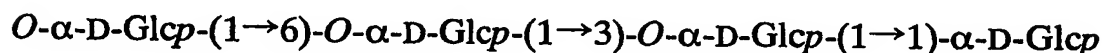
【0065】

以上の構造解析データから、転移糖Aは図3に示す構造を有する糖質、即ち、化学式2で示される3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースであることが判明した。

【0066】

化学式2:

【化2】



【0067】

&lt;実験5: 部分分解物Bの調製&gt;

実験3の方法で得られた3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース精製物の約半量(固形物として0.8g)を用いて、糖濃度2%、pH4.5の水溶液を調製し、それにグルコアミラーゼ(商品名『グルコチーム#12000』、ナガセ生化学工業株式会社販売)を固形物1グラム当り3,000単位加え、50℃で24時間反応させた後、100℃で10分間加熱して酵素を失活させ、反応を停止した。得られた反応液を濾過、脱塩した後、HPLCで分析した。HPLCの結果を表5に示す。

【0068】

【表5】

HPLCの溶出時間(分)	糖質の種類	糖組成(%)
44.2	3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	2.5
47.0	部分分解物B	71.7
58.9	グルコース	25.8

## 【0069】

表5に示すように、未反応の3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース(溶出時間44.2分)、グルコアミラーゼが3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースに作用して生成するグルコース(溶出時間58.9分)の他に、グルコアミラーゼが3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースに作用して生じたと考えられる部分分解物B(以下、単に「部分分解物B」と略称する。)(溶出時間47.0分)が検出され、その生成量は糖組成として71.7%であることがわかった。グルコアミラーゼの反応特異性を考慮すると、生成した部分分解物Bは、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースにグルコース残基が $\alpha$ -1, 3結合した構造を有する3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースと推定された。得られた反応物を、実験3に記載の分取HPLCに供したところ、グルコースは溶出時間約34乃至48分に溶出し、部分分解物Bは溶出時間約44乃至48分に溶出し、未反応の3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースが溶出時間53乃至60分に溶出した。部分分解物Bを含有する画分を回収し、濾過、濃縮して、固形物として0.49グラムの部分分解物B精製物を得た。HPLCで分析したところ、糖組成として、部分分解物Bが99.9%以上であり、極めて高純度の部分分解物B標品であることがわかった。

## 【0070】

<実験6：部分分解物Bの構造解析>

## 【0071】

<実験6-1：質量分析>

実験5の方法で得られた部分分解物B精製物を、実験4-1に記載の方法で質量分析したところ、質量数527のナトリウム付加分子イオンが顕著に検出され、本糖質の質量数が504であることが判明した。

## 【0072】

<実験6-2：構成糖の分析>

実験5の方法で得られた部分分解物B精製物について、常法に従って硫酸で加水分解した後、ガスクロマトグラフィー法で構成糖を調べたところ、D-グルコースのみが検出され、本糖質の構成糖はD-グルコースであることが判明した。

## 【0073】

<実験6-3：メチル化分析>

実験5の方法で得られた部分分解物B精製物について、常法に従ってメチル化した後、酸により加水分解し、続いて還元、アセチル化し、得られた部分メチルヘキシトールアセテートをガスクロマトグラフィー法で調べた。その結果、2, 3, 4, 6-テトラメチル-1, 5-ジアセチルグルシトールと2, 4, 6-トリメチル-1, 3, 5-テトラアセチルグルシトールとが2.1 : 1.0の比率で検出され、本糖質は、1位が結合に関与したグルコース残基が2分子と、1位と3位が結合に関与したグルコース残基が1分子とからなることが判明した。

## 【0074】

<実験6-4：核磁気共鳴法(NMR)>

実験5の方法で得られた部分分解物B精製物についてNMR分析したところ、図4に示す<sup>1</sup>H-NMRスペクトル及び図5に示す<sup>13</sup>C-NMRスペクトルが得られ、これらスペクトルから本糖質における各炭素の化学シフト値の帰属を行なった。結果を表6に示す。

## 【0075】

【表 6】

グルコース残基	炭素番号	化学シフト値 (ppm)
a	1	95.4
	2	73.3
	3	74.8
	4	72.0
	5	74.1
	6	62.9
b	1	95.6
	2	72.3
	3	82.7
	4	71.9
	5	74.5
	6	62.8
c	1	101.7
	2	74.1
	3	75.2
	4	72.0
	5	74.2
	6	62.6

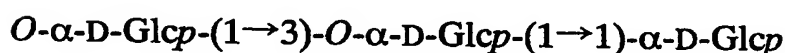
【0076】

以上の構造解析データから、部分分解物 B は図 6 に示す構造を有する糖質、即ち、化学式 3 で示される 3- $\alpha$ -グルコシル  $\alpha$ ， $\alpha$ -トレハロースであることが確認された。

【0077】

化学式 3：

【化 3】



【0078】

以下、本発明の 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ， $\alpha$ -トレハロース類及びそれを含む糖質の製造方法を実施例 1 乃至 8 で、また、3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ， $\alpha$ -トレハロース類及びそれを含む糖質を含有せしめた組成物を実施例 9 乃至 19 で示す。

【実施例 1】

【0079】

$\alpha$ ， $\alpha$ -トレハロース（（株）林原商事販売、登録商標『トレハ』）とパノース（（株）林原生物化学研究所製造）をそれぞれ 25%濃度と 9.2%濃度になるように水に混合、溶解させた後、pH 6.0、温度 35℃に調製し、これに実験 1-2 の方法で調製した  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を有する部分精製酵素標品をパノース 1g 当たり 2 単位の割合になるように加え、48 時間反応させた。その反応液を 95℃に加熱し 10 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 型及び O H 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に、濃縮し、乾燥し、粉碎して、3- $\alpha$ -イソマルトシル  $\alpha$ ， $\alpha$ -トレハロース含有粉末を固形物当たり収率約 91%で得た。

【0080】

本品は、固形物当たり、グルコース 8.0%、 $\alpha$ ， $\alpha$ -トレハロース 66.3%、3- $\alpha$ -イソマルトシル  $\alpha$ ， $\alpha$ -トレハロース 13.9%、環状四糖 6.0%、及びその他の

糖質を5.8%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【実施例2】

【0081】

実施例1の方法で得た3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有粉末を温水に溶解し、濃度60%に調整した後、強酸性カチオン交換樹脂（アンバーライトCR-1310、Na型、オルガノ株式会社製造）を用いたカラム分画を行なった。樹脂を内径5.4cmのジャケット付きステンレス製カラム4本に充填し、直列につなぎ樹脂層全長20mとした。カラム内温度60℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに60℃の温水をSV0.13で流して分画し、溶出液の糖組成をHPLC法でモニターし、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有画分を採取し、脱塩し、濃縮して、濃度70%の3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有シラップを固形物当たり収率約16%で得た。

【0082】

本品は、固形物当たり、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース61.5%、環状四糖38.3%、及びその他の糖質を0.2%含有しており、還元性をほとんど示さず、アミノカルボニル反応を起こしにくく、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【実施例3】

【0083】

実施例2の方法で得た3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有シラップを濃度2%、pH5.0、温度50℃に調整し、これに実験3に記載の方法で調製したイソマルトデキストラナーゼを固形物グラム当たり500単位の割合になるように加え、48時間反応させた。その反応液を95℃に加熱し10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に、濃度65%に濃縮した後、実施例2に記載の強酸性カチオン交換樹脂を用いたカラム分画を行ない、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース高含有画分を採取し、脱塩し、濃縮し、乾燥し、粉碎して、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース高含有粉末を固形物当たり収率約48%で得た。

【0084】

本品は、固形物当たり、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを98%含有しており、実質的に還元性を示さず、アミノカルボニル反応を起こしにくく、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【実施例4】

【0085】

実施例1の方法で得た3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有粉末を温水に溶解し、濃度10%、pH4.5、温度50℃に調整し、これにグルコアミラーゼ剤（ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名「グルコチーム」）を固形物1g当たりそれぞれ1000単位の割合になるように加え、48時間反応させた。その反応液を95℃に加熱し10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に、濃度65%に濃縮して、3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有シラップを固形物当たり収率約95%で得た。

【0086】

本品は、固形物当たり、グルコース14.7%、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース66.2%、3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース11.0%、環状四糖6.0%、及びその他の糖

質を2.1%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【実施例5】

【0087】

実施例4の方法で得た3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース含有シラップを原料に用いて、実施例2に記載の強酸性カチオン交換樹脂を用いたカラム分画を行ない、3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース高含有画分を採取し、脱塩し、濃縮し、乾燥し、粉碎して、3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース高含有粉末を固形物当たり収率約6%で得た。

【0088】

本品は、固形物当たり、3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースを98%含有しており、実質的に還元性を示さず、アミノカルボニル反応を起こしにくく、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【実施例6】

【0089】

実験1-1の方法で得た培養上清約18LをUF膜濃縮し、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を7.7単位/mlと $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を25.3単位/ml含有する濃縮酵素液約1Lを回収した。

【0090】

$\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース（株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』）とタピオカ澱粉をそれぞれ濃度約12.5%含む澱粉乳とし、これに $\alpha$ -アミラーゼ（商品名『ネオスピターゼ』、ナガセ生化学工業（株）製）を澱粉固形物1g当たり0.2%加え、85乃至90℃で約20分間反応させ、次いで120℃に20分間オートクレーブし、更に約35℃に急冷してDE約2の $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース含有液化溶液を得、これに上記の濃縮酵素液を澱粉固形物1g当たり0.3mlの割合になるように加え、pH6.0、温度35℃で48時間反応させた。その反応液を95℃で30分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度70%の3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース含有シラップを原料固形物当たり収率約90%で得た。

【0091】

本品は、固形物当たり、グルコース2.7%、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース40.2%、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース18.2%、環状四糖9.8%、及びその他の糖質を29.1%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【実施例7】

【0092】

実施例6の方法で得た3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース含有シラップを、濃度30%、pH4.5、温度50℃に調整し、これにグルコアミラーゼ剤（ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名「グルコチーム」）を1g当たりそれぞれ1,000単位の割合になるように加え、48時間反応させた。その反応液を95℃に加熱し10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、濃縮した後、常法に従って、水素添加して還元性糖を糖アルコール化し、再度、脱色し、脱塩し、濃縮し、乾燥し、粉碎して、3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース含有粉末を固形物当たり収率約85%で得た。

【0093】

本品は、固形物当たり、ソルビトール18.3%、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース42.1%、

3- $\alpha$ -グルコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース 13.7%、環状四糖 9.9%、及びその他の糖アルコールなどを 16.0% 含有しており、実質的に還元性を示さず、アミノカルボニル反応を起こしにくく、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【実施例 8】

【0094】

実施例 5 の方法により得た 3- $\alpha$ -グルコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース 高含有粉末と乳糖をそれぞれ約 25% 含む水溶液とし、これを pH 6.0、温度 40℃ に調整した後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ剤（大和化成（株）製、商品名「ビオラクタ」）を乳糖固形物当たり 3 単位の割合になるように加え、pH 6.0、温度 40℃ で 24 時間反応させた。その反応液を 95℃ で 30 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って活性炭で脱色し、H 型及び O H 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 70% の 4- $\beta$ -ガラクトシル-3- $\alpha$ -グルコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース 含有シラップを原料固形物当たり収率約 90% で得た。

【0095】

本品は、固形物当たり、グルコース 22.7%、ガラクトース 3.4%、乳糖 5.9%、3- $\alpha$ -グルコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース 35.1%、4- $\beta$ -ガラクトシル-3- $\alpha$ -グルコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース 13.5%、及びその他の糖質を 19.4% 含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【実施例 9】

【0096】

<甘味料>

実施例 1 の方法により得た粉末状 3- $\alpha$ -イソマルトシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース 含有物 1 重量部に、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド（商品名『 $\alpha$ G スイート』、東洋精糖株式会社販売）0.01 重量部、及び L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル（商品名『アスパルテム』）0.01 重量部を均一に混合し、顆粒成形機にかけて顆粒状甘味料を得た。本品は、3- $\alpha$ -イソマルトシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース を含有し、甘味の質に優れた、蔗糖の約 2 倍の甘味度を有する甘味料組成物である。又、本品は、室温保存下、変質劣化の懸念が無く、安定である。

【実施例 10】

【0097】

<ハードキャンディー>

濃度 55% 蔗糖溶液 100 重量部に実施例 6 の方法で得たシラップ状 3- $\alpha$ -イソマルトシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース 含有物 50 重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分 2% 未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸 0.6 重量部及び適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成形し、製品を得た。本品は歯切れ、呈味、風味とも良好で、蔗糖の晶出も起きず、吸湿性少ない安定で高品質のハードキャンディーである。

【実施例 11】

【0098】

<チューインガム>

ガムベース 3 重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに無水結晶マルチトール 2 重量部、キシリトール 2 重量部、実施例 4 の方法で得たシラップ状 3- $\alpha$ -グルコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース 含有物 3 重量部を加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。本品は、テクスチャー、呈味、風味良好で、低う蝕性、低カロリーのチューインガムとして好適である。

【実施例 12】

【0099】

## &lt;粉末ペプチド&gt;

40%食品用大豆ペプチド溶液(商品名『ハイニユートS』、不二製油株式会社販売) 1重量部に、実施例2の方法で得たシラップ状3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有物2重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、50℃で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。本品は風味良好で、プレミックス、冷菓などの低カロリー製菓材料として有用であるのみならず、経口流動食、経管流動食のための難消化性の食物繊維、整腸材料、健康食品材料としても有用である。

## 【実施例13】

## 【0100】

## &lt;浴用剤&gt;

ユズの皮ジュース1重量部に対して、実施例2の方法で得たシラップ状3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有物10重量部の割合で混合し、噴霧乾燥して粉末化して、ユズの皮エキス含有3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有粉末を得た。

## 【0101】

本粉末5重量部に、焼塩90重量部、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含水結晶2重量部、無水ケイ酸1重量部及び $\alpha$ -グルコシルヘスペリジン(商品名『 $\alpha$ Gヘスペリジン』、株式会社林原販売)0.5重量部を混合して浴用剤を製造した。

## 【0102】

本品は、ユズの香りも豊かで、入浴用の湯に100乃至10、000倍に希釈して利用すればよく、入浴後は、肌がしっとりしなめらかで、湯冷めしない高品質の浴用剤である。

## 【実施例14】

## 【0103】

## &lt;化粧用クリーム&gt;

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例2の方法で得たシラップ状3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース高含有物2重量部、 $\alpha$ -グルコシルルチン(商品名『 $\alpha$ Gルチン』、株式会社林原販売)1重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリン10重量部及び防腐剤の適量を常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸2重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部及び精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合し、化粧用クリームを製造した。本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

## 【実施例15】

## 【0104】

## &lt;練歯磨&gt;

第二リン酸カルシウム45重量部、ラウリル硫酸ナトリウム1.5重量部、グリセリン25重量部、ポオキシエチレンソルビタンラウレート0.5重量部、実施例7の方法で得た粉末状3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有物13重量部、サッカリン0.02重量部及び防腐剤0.05重量部を水15重量部と混合して練歯磨を得た。本品は、界面活性剤の洗浄力を落とすことなく、嫌味を改良し、使用後感も良好である。

## 【実施例16】

## 【0105】

## &lt;流動食用固体製剤&gt;

実施例1の方法で得た粉末状3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含有物200重量部、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース含水結晶100重量部、マルトテトラオース高含有粉末200重量部、粉末卵黄270重量部、脱脂粉乳209重量部、塩化ナトリウム4.4重量部、塩化カリウム1.8重量部、硫酸マグネシウム4重量部、チアミン0.01重量部、アスコルビン酸ナトリウム0.1重量部、ビタミンEアセテート0.6重量部及びニコチン酸アミド0.04重量部からなる配合物を調製し、この配合物25グラムずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。

## 【0106】

本品は、安定性に優れた流動食用固体製剤である。本品1袋分を約150乃至300mlの水に溶解して流動食とし、経口的、又は鼻腔、胃、腸などへ経管的使用方法により利用され、生体へのエネルギー補給用に有利に利用できる。

## 【実施例17】

## 【0107】

## &lt;錠剤&gt;

アスピリン50重量部に実施例3の方法で得た粉末状3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース高含有物14重量部、コーンスターチ4重量部を十分に混合した後、常法に従って打錠機により打錠して厚さ5.25mm、1錠680mgの錠剤を製造した。

## 【0108】

本品は、3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースの賦形性を利用したもので、吸湿性がなく、物理的強度も充分にあり、しかも水中での崩壊はきわめて良好である。

## 【実施例18】

## 【0109】

## &lt;糖衣錠&gt;

重量150mgの素錠を芯剤とし、これに実施例3の方法で得た粉末状3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース高含有物40重量部、プルラン（平均分子量20万）2重量部、水30重量部、タルク25重量部及び酸化チタン3重量部からなる下掛け液を用いて、錠剤重量が約230mgになるまで糖衣し、次いで、環状四糖結晶粉末65重量部、プルラン1重量部及び水34重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢のある外観の優れた糖衣錠を得た。本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

## 【実施例19】

## 【0110】

## &lt;外傷治療用膏薬&gt;

実施例5の方法で得た粉末状3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース高含有物70重量部、マルトース300重量部、及び蒸留水30重量部に、ヨウ素3重量部を溶解したメタノール50重量部を加え混合し、更に10w/v%プルラン水溶液200重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。本品は、3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを含有する、経時変化の少ない商品価値の高い膏薬である。また、本品は、ヨウ素による殺菌作用のみならず、マルトースによる細胞へのエネルギー補給剤としても作用することから治癒期間が短縮され、創面もきれいに治る。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0111】

本発明の新規3- $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース類とその製造方法並びに用途の確立は、飲食物、化粧品、医薬品分野における工業的意義が極めて大きい。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0112】

【図1】 転移糖A精製物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す図である。

【図2】 転移糖A精製物の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す図である。

【図3】 3- $\alpha$ -イソマルトシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースの構造を示す図である。

【図4】 部分分解物B精製物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す図である。

【図5】 部分分解物B精製物の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す図である。

【図6】 3- $\alpha$ -グルコシル $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースの構造を示す図である。

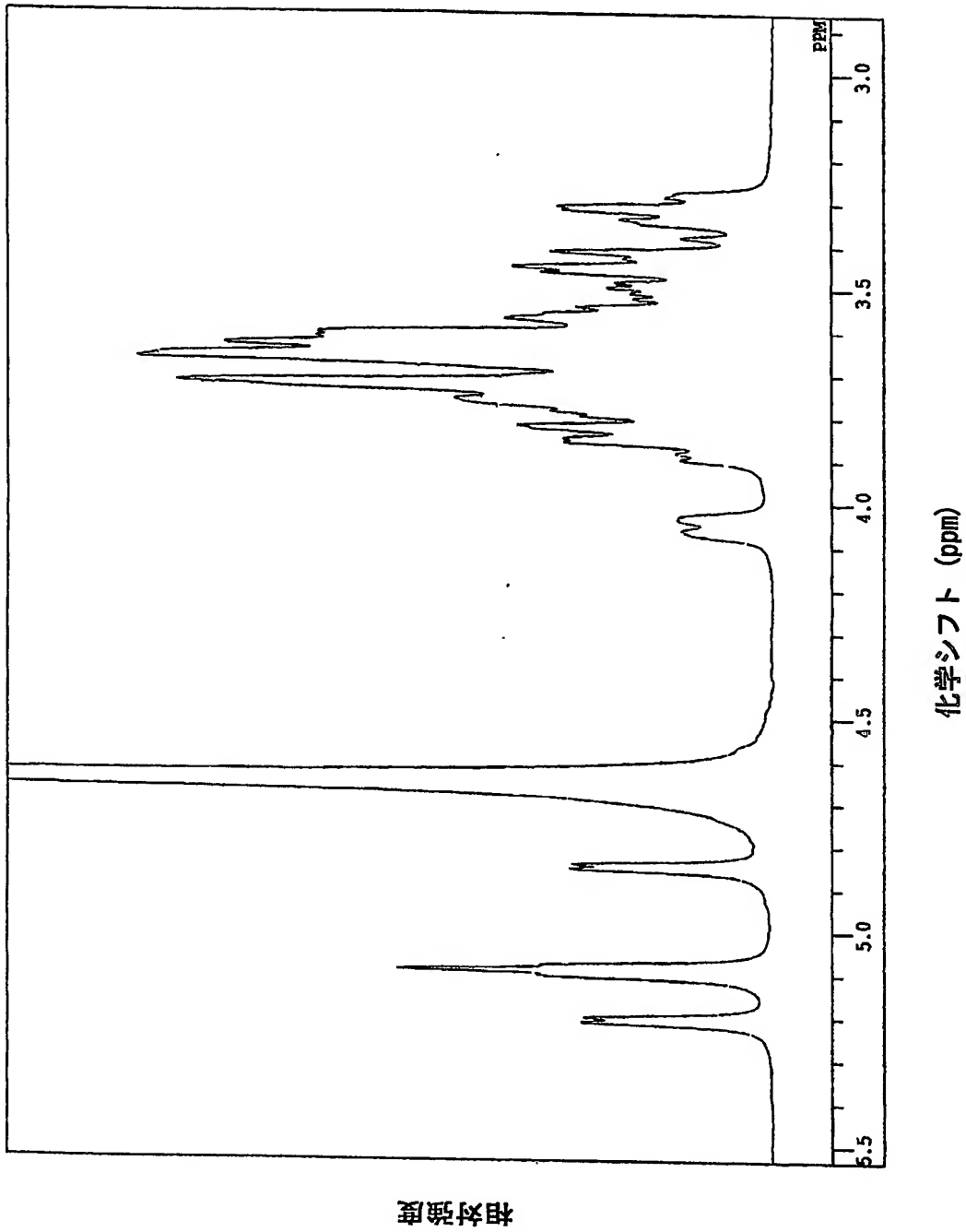
## 【符号の説明】

## 【0113】

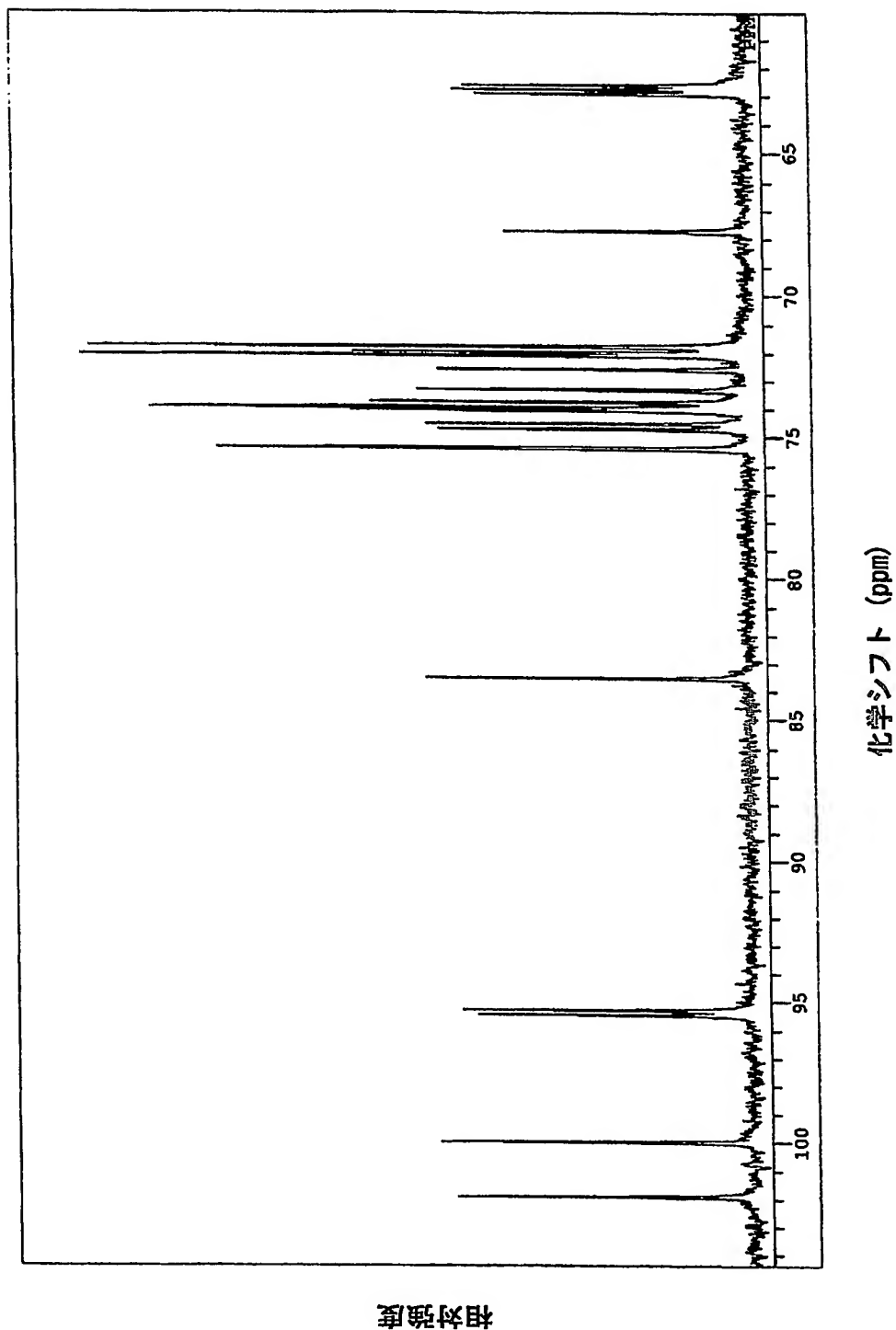
図3及び図6中のa、b、c及びdはグルコース残基を意味し、表4及び表6中のグルコース残基a、b、c及びdに対応している。



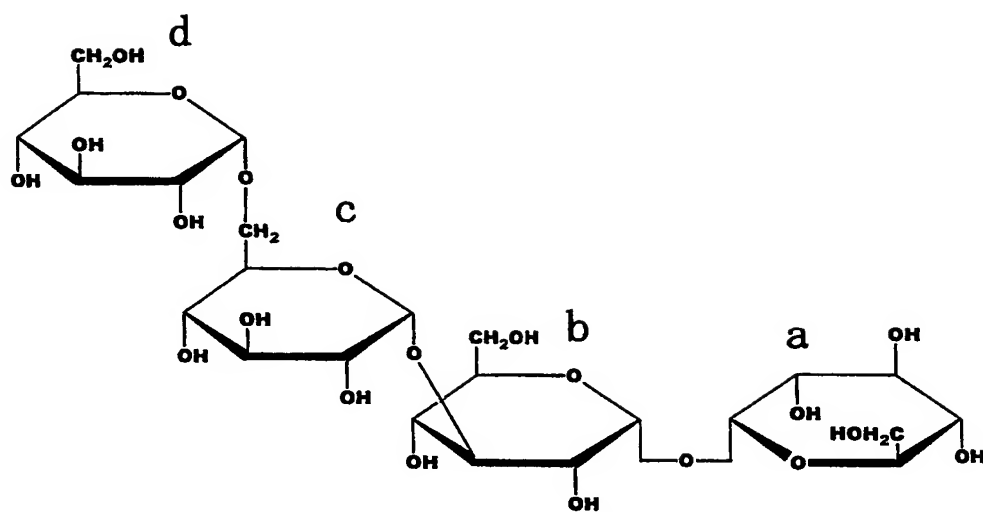
【書類名】 図面  
【図 1】



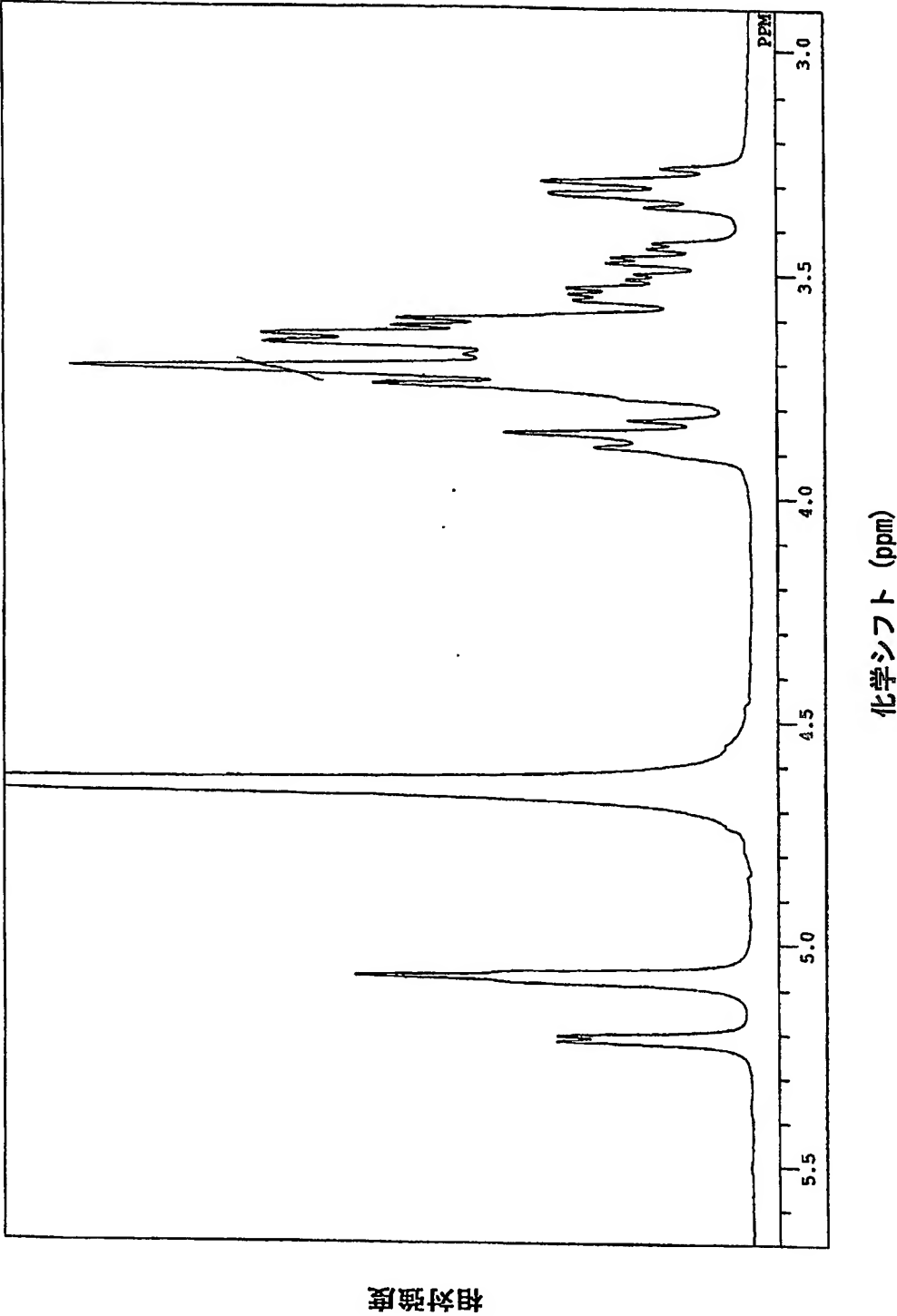
【図 2】



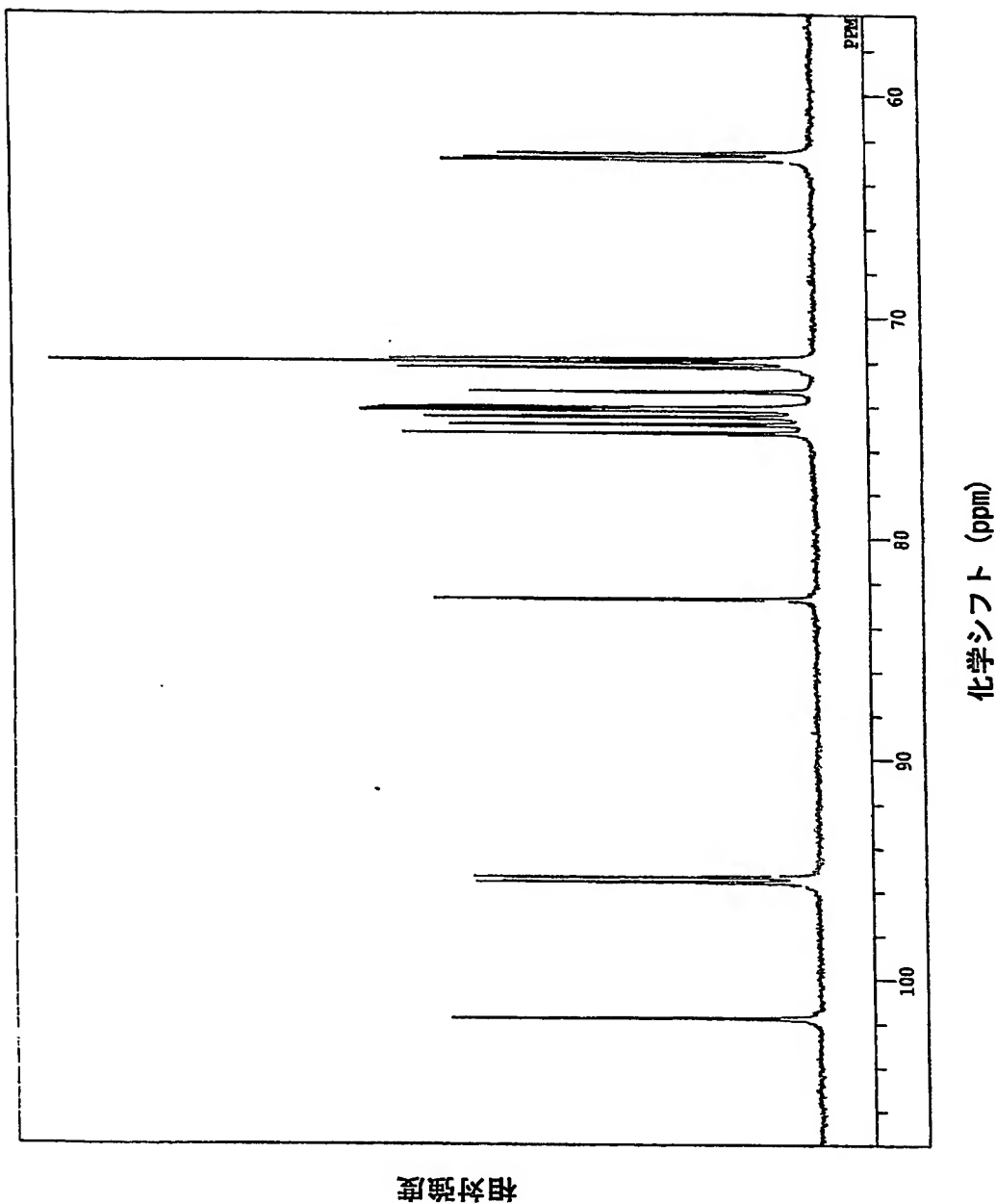
【図 3】



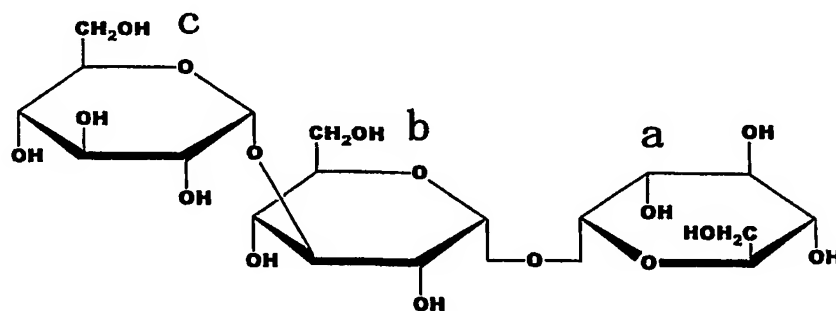
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

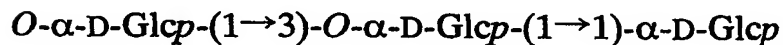
【要約】

【課題】 分子内に化学式 1 で示される 3- $\alpha$ -グルコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース構造を有する新規糖質 3- $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類とその製造方法並びに用途を提供する。

【解決手段】 分子内に化学式 1 で示される  $\alpha$ -グルコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース構造を有する  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース類とその製造方法並びに用途を提供することにより上記課題を解決する。

化学式 1:

【化 1】



【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 2 7 6 6 3 2
受付番号	5 0 3 0 1 1 9 6 3 0 3
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 7 月 2 2 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年 7月18日

特願 2 0 0 3 - 2 7 6 6 3 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 1 5 5 9 0 8 ]

1. 変更年月日 1 9 9 8 年 1 0 月 2 1 日

[変更理由] 住所変更

住 所 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号

氏 名 株式会社林原生物化学研究所



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**